

CLIPPEDIMAGE= JP401143874A

PAT-NO: JP401143874A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 01143874 A

TITLE: FLUORESCENT POLARIZATION IMMUNOASSAY FOR MEASUREMENT OF  
PHENYLACETYLGLUTAMINE

PUBN-DATE: June 6, 1989

INVENTOR-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
ADAMCZYK, MACIEJ B	N/A
GHANBARI, HOSSEIN A	N/A
JOHNSON, DONALD D	N/A

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME	COUNTRY
ABBOTT LAB	N/A

APPL-NO: JP63262675

APPL-DATE: October 18, 1988

INT-CL (IPC): C07D493/10;C07C103/84 ;C07K015/12 ;C09B011/00 ;G01N033/53  
;G01N033/533 ;G01N033/542

ABSTRACT:

PURPOSE: To shorten the total analysis time of a reagent by using an antibody produced against an immunogen consisting of a conjugate of the subject compd. included in body fluids and a polyamino acid at the time of detecting the subject compd. by a fluorescent polarization immunoassay.

CONSTITUTION: At the time of detecting the phenylacetylglutamine(PAG) in the blood or urea used for diagnosis of mania or depression by the fluorescent polarization immunoassay, the conjugate of (a) an antibody produced against the immunogen expressed by formula I (R

COPYRIGHT: (C)1989,JPO

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成1年(1989)6月6日

C 07 D 493/10  
C 07 C 103/84  
C 07 K 15/12

E-8615-4C  
T-7419-4H  
8318-4H※

審査請求 未請求 請求項の数 10 (全10頁)

⑭ 発明の名称 フェニルアセチルグルタミンの測定のための蛍光偏光イムノアッセイ法

⑮ 特 願 昭63-262675

⑯ 出 願 昭63(1988)10月18日

優先権主張 ⑰ 1987年10月19日 ⑱ 米国(U S) ⑲ 110155

⑳ 発 明 者 マシー・ボグダン・ア アメリカ合衆国イリノイ 60046、リンデンハースト、ス  
マンツイツク ブルースウツド・レイン 2015番

㉑ 発 明 者 ホセイン・アリ・ガー アメリカ合衆国イリノイ 60048、リバティビル、タマラ  
ンバリ ツク・レイン 1021番

㉒ 出 願 人 アボット・ラボラトリ アメリカ合衆国イリノイ 60064、アボット・パーク (番  
ーズ 地の表示なし)

㉓ 代 理 人 弁理士 青 山 葆 外1名  
最終頁に続く

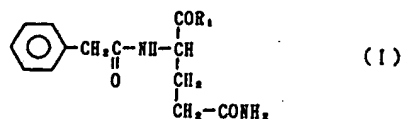
## 明 細 書

## 1. 発明の名称

フェニルアセチルグルタミンの測定のための  
蛍光偏光イムノアッセイ法

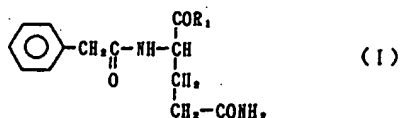
## 2. 特許請求の範囲

(1) 下記式(1):



(式中、R<sub>1</sub>はポリアミノ酸である)で示される免  
疫源に対して産生される抗体。

(2) 哺乳動物に下記式(1):



(式中、R<sub>1</sub>はポリアミノ酸である)で示される免  
疫源を接種することにより得られる抗血清。

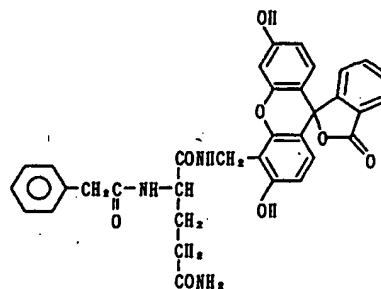
(3) 特許請求の範囲第(1)項記載の抗体を用いる

ことを特徴とするイムノアッセイ法。

(4) 特許請求範囲第(2)項記載の抗血清および標  
識フェニルアセチルグルタミンを用いることを特  
徴とするイムノアッセイ法。

(5) 前記標識フェニルアセチルグルタミンがフル  
オレセインとフェニルアセチルグルタミンとの結  
合体からなる特許請求の範囲第(4)項記載のイム  
ノアッセイ法。

(6) 下記式で示される、フェニルアセチルグルタ  
ミンのイムノアッセイに用いる結合体。

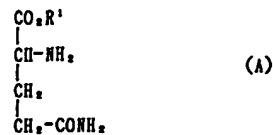


(7)(a) 試料を特許請求の範囲第(1)項記載の抗  
体に接触させ、

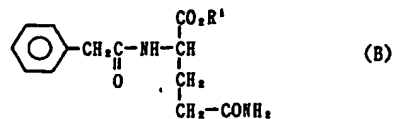
(b) 試料を特許請求の範囲第(6)記載の結合体に接触させ、ついで

(c) 試料の蛍光偏光を測定することにより試料中のフェニルアセチルグルタミンの量を決定することからなる、試料中のフェニルアセチルグルタミンのイムノアッセイ法。

(8)(a) フェニル酢酸を下記式(A):



(式中、R<sup>1</sup>はカルボキシ保護基である)で示されるグルタメートと結合させて下記式(B):



(式中、R<sup>1</sup>は前記と同じ)で示される化合物を得、ついで

(b) 上記保護基を脱離させてフェニルアセチルグ

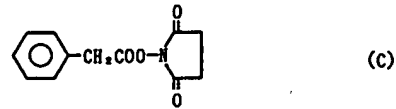
感情の行動に関する2-フェニルエチルアミン(以下、PEAという)理論によれば、脳におけるPEAレベルの上昇は躁病を予告し、一方、PEAが相対的に欠損状態にあるときはある種の鬱病の発現に主要な役割を果たす。PEAの酸化的脱アミノ化によりフェニル酢酸(以下、PAAという)が代謝的に生成し、PAAはPAGとして結合体のかたちでほぼ全部が尿により排出されるので、PAGをモニターするアッセイは躁病や鬱病の診断に有用である。

血液または尿中のPAGレベルを決定するのに従来用いられていた方法では、PAGをPAAに加水分解することが行われていた。ついでこのPAAを蛍光測定手順により定量する[ブルトン(A. A. Boulton)のProgr. Neurogenetics, 1:937(1987)またはgas chromatography;ブラウ(K. Blau)のClin. Chim. Acta, 27:5-18(1970);クルチウス(H. Curtius)らのClin. Chim. Acta, 27:277-285(1972);グッドウィン(Goodwin)らのClin. Chim. Acta, 62:443(1975);デービス(Davis)らのJournal of Chromatog

ラミンを得る、ことからなるフェニルアセチルグルタミンの製造方法。

(9) 上記式中、R<sup>1</sup>がヒープテル基である特許請求の範囲第(8)項記載の製造方法。

(10) フェニル酢酸とグルタメートとの結合を、フェニル酢酸をN-ヒドロキシスクシンイミドと結合させて下記式(C):



で示される化合物を得、ついで化合物(C)をグルタミンヒープテルエステルと結合させることにより行なう特許請求の範囲第(9)項記載の製造方法。

### 3. 発明の詳細な説明

#### (産業上の利用分野)

本発明は、体液中に含まれるフェニルアセチルグルタミン(PAG)の検出のためのイムノアッセイ法、該アッセイに有用な抗体およびフルオレsein結合体に関する。

(従来技術および発明が解決しようとする課題)

raphy, 222:161-169(1981);フェロウズ(Fellows)らのBiochemical Mass Spectrometry, Vol. 5, No. 8(1978);マーキン(Markin)らのAnalytical Biochemistry, 99:283-287(1979)参照]。しかしながら、これらの試験は極めて長時間を要するものである。一般にわずか数個の試料を一日に分析できるにすぎない。加えて上記分析に用いる装置は高価であり、ガスクロマトグラフィーやマススペクトルを用いた場合には数10万ドルを要することがしばしばである。

上述したように、本発明者らはPAGのための新規な蛍光偏光イムノアッセイ試験法を開発した。一般に内生的な(endogenous)物質(PAGは患者における内生的な物質である)については、内生的な物質の蛍光偏光イムノアッセイに必要とされるインキューション時間は、一般に数〜数十分を要する。従って、一定の試料についての全分析時間は20分〜120分の間である。

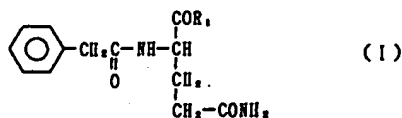
(課題を解決するための手段)

本発明者らは、PAGの蛍光偏光イムノアッセ

イの用いるためにPAGに対する抗体を産生させていたところ、該試験に用いるために産生させた抗体の特徴が完全に予期に反するものであることを見いだした。この産生された抗体によりインキュベーション時間が3分未満であり、従って試料の全分析時間がわずかに約6分である試験が可能となった。事実、本発明者らは、アボットTDXアナライザー上でわずか13分の短い時間のうちに20の試料を分析することができることを見いだした。このことは本発明者らの蛍光偏光イムノアッセイにおける従前の経験からみて予期に反するばかりでなく、従来用いられていたガスクロマトグラフィー/マススペクトル分析に対して分析時間を大きく短縮させるものである。

(発明の構成および効果)

本発明の抗体は、式(1)：

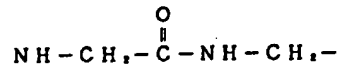


る)は、蛍光団標識試薬(「リガンド類似体」または「トレーサー」と、該リガンドおよびリガンド類似体に特異的な抗体上に存在する限られた数のレセプター結合部位について競合する。試料中に存在するリガンドの濃度は、抗体に結合するリガンド類似体の量を決定する。これについての一般的な方法はワング(Wang)らの米国特許第4,420,588号明細書に記載されている。リガンドおよびリガンド類似体は、それぞれの濃度に比例して抗体に結合するので、抗体に結合するリガンド類似体の量は試料中に存在するリガンドの濃度と反比例する。

蛍光偏光法は、競合結合イムノアッセイにおいて得られたトレーサー-抗体結合体の量を測定するために用いることができる。蛍光偏光法は、蛍光標識化合物が平面偏光により励起されたときに回転の速度とは反比例した偏光度の蛍光を放射するという原理に基づいている。従って、蛍光団は光が吸収される時間と光が放出される時間との間の回転が抑えられるので、蛍光標識を有するト

(式中、R<sub>1</sub>はポリアミノ酸、好ましくはウシ血清アルブミンである)で示される化合物に対して産生される。

本発明はまた、上記式(1)においてR<sub>1</sub>がフルオレセインであるフルオレセイントレーサー、または式：



で示されるリンカーにより式(1)の化合物に結合されたフルオレセインを包含するものである。

本発明の他の態様は、上記免疫源やトレーサーを製造する方法、およびPAGを合成的に製造する方法に関する。

本発明の蛍光偏光イムノアッセイ(FPIA)法は、イムノアッセイの特異性と均一法のスピードおよび便利さとを組み合わせたものであり、尿や血液中のPAGレベルをモニターするための正確で信頼性のある手順を提供する。

蛍光偏光イムノアッセイにおいては、測定しようとする生物学的物質(通常「リガンド」と称され

レーサー-抗体結合体が平面偏光で励起されたときに光は依然高度に偏光されたままである。これとは対照的に、未結合トレーサーが平面偏光により励起されたときには、その回転は対応するトレーサー-抗体結合体よりもはるかに速く、その結果、未結合トレーサーから放出される光は光の吸収時間と放出時間との時間間隔の間に偏光が解消される。偏光の減少は、試料中に存在するリガンドの量を表す指標となる。

つぎに免疫源およびトレーサーの合成、本発明によるPAGの蛍光偏光イムノアッセイに用いる抗体の産生を以下に述べる。

#### 免疫源の合成

本発明の免疫源は、ハプテン、たとえば式(1)においてR<sub>1</sub>がOHである構造で示されるものをポリアミノ酸または他の免疫学的に活性な担体に結合させることにより得ることができる。ポリアミノ酸または他の担体残基は、アミド(ペプチド)、カルバメート、チオエーテル、エーテル、ジアゾまたはアミノの各結合によりハプテンに結合させ

ることができる。好ましい実施態様においては、ポリアミノ酸はウシ血清アルブミン(BSA)である。これらの反応物は、アミド結合を生成させるときに通常用いられる条件下で結合させるのが好ましく、このような条件は当業者にはよく知られたものである。

免疫源は、CHO基、カルボキシル基、アミノ基、水酸化物基またはヨードアセチル基を有するハプテンをポリアミノ酸または他の免疫学的に活性な担体に結合させることにより製造することができる。-CHO基は、シッフ塩基を生成させ、これを水素化シアノホウ素ナトリウムで直ちに還元して安定なアミノメチル結合を生成させることにより結合させることができる。ハプテンまたはポリアミノ酸上のカルボキシル基の活性化は、ハプテンおよびポリアミノ酸を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミドメチル-p-トル

N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドの活性化によるものである。他の活性化基、たとえば酸塩化物、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノール、2-エチル-5-フェニルイソキサゾリウム3スルホネートなども用いることができる。

トレーサーの合成の例は実施例3および4に記載してある。

#### 抗体の産生

本発明に用いる抗体を産生させるための手順には、動物、好ましくはウサギに本発明の免疫源を注射することが含まれる。動物はハプテンに対する抗体を産生するので、免疫した動物を出血させ血清を単離することによって抗体を集めることができる。集めた血清は-20℃で貯蔵する。

本発明による抗体を産生させるための好ましい方法は実施例5に記載してある。

つぎに実施例に基づいて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限られるものではない。

エンスルホネートなどと混合することにより行うことができる。

免疫源の合成の例は実施例1および2に記載してある。

#### トレーサーの合成

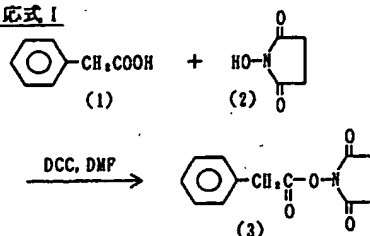
本発明のトレーサーは、フルオレセイン残基またはフルオレセイン誘導体を式(1)で示される一般的な構造で示される化合物に結合させることにより得ることができる。

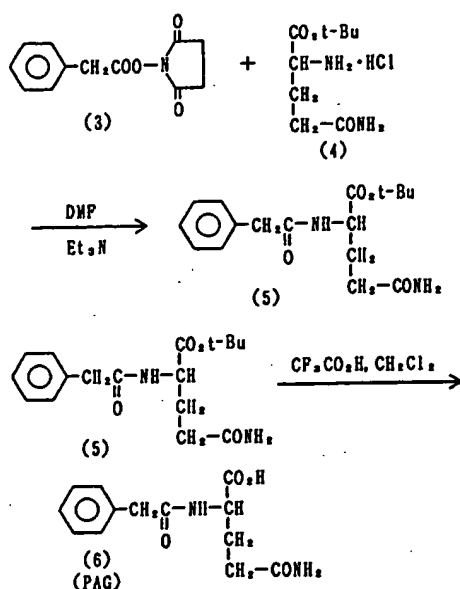
フルオレセイン残基は、アミド、アミン、尿素、カルバメートまたはトリアジニルアミノの各結合によりアミノ基、カルボキシル基、アルデヒド基または酸塩化物基に結合させることができる。現在のところ好ましい実施態様においては、フルオレセイン誘導体はPAGに結合したアミノメチルフルオレセインである。PAGのアミノメチルフルオレセインへの結合は、まずPAGのカルボキシル基で活性エステルを生成することにより行う。好ましい活性エステルはN-ヒドロキシスクシンイミド活性エステルであり、好ましい方法はN、

#### 実施例1 [フェニルアセチルグルタミン(PAG)の合成]

すでに述べたように、本発明はPAGを合成するための新規な方法にも関する。本発明の最も広い態様において、本方法はフェニル酢酸をグルタミンに結合させることを含む。その際、グルタミン上のカルボン酸残基はベンジルまたは1-ブチルなどのカルボキシル保護基[「カルボキシル保護基」なる語は技術分野で知られており、ベンジル、1-ブチル、p-ニトロフェニル、メチルなどを含む(グリーン(T. Green)のProtective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, 152-192頁(1981)参照)]で保護されている。結合させた後、ついでカルボン酸残基を脱保護してPAGを得る。

#### 反応式1





上記反応式 I に示したように、フェニル酢酸 1 (1250mg、1.84ミリモル)をカルボキシル基保護グルタミン 4 (この場合は t-ブチル基のような低級アルキル基で保護されている)に結合させるため、まずフェニル酢酸を無水ジメチルホルムアミド (8ml)中に溶解させた。N-ヒドロキシ

マスペクトル (DEI/DIP): 321(M+H)<sup>+</sup>, 320 M<sup>+</sup>, 264(M-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sup>+</sup>, 247(M-OC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sup>+</sup>

フェニルアセチルグルタミンの t-ブチルエステル 5 (295mg、0.924ミリモル)を塩化メチレン (4ml)中に溶解しトリフルオロ酢酸 (4ml)を加えることにより脱保護した (すなわち t-ブチルカルボキシ保護基をはずした)。45分後に反応混合物を真空下で蒸発させ、テトラヒドロフラン (THF)から油状残渣を結晶化させてフェニルアセチルグルタミン 6 の透明な結晶を得た。

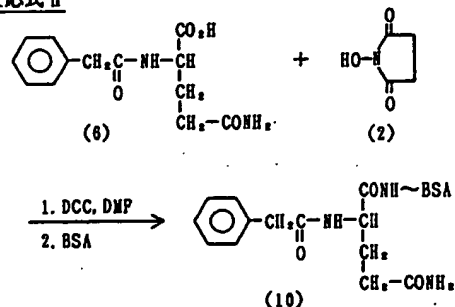
<sup>1</sup>H-NMR (300MHz) (CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD) δ ppm: 1.9~2.05 (mult, 1H), 2.13~2.36 (mult, 3H), 3.58 (s, 2H), 4.5 (mult, 1H), 7.23~7.38 (mult, 5H)

マスペクトル (pos. FAB, MeOH): 265(M+H)<sup>+</sup> (100%)  
フェニル酢酸をカルボキシ保護グルタミンに結合させる他の方法は当業者には明らかであろう。また t-ブチル以外のカルボキシ保護基もまた当業者には明らかであろう。

**実施例 2** (ウシ血清アルブミンへのフェニルアセチルグルタミンの結合)

スクシンイミド 2 (254mg、2.2ミリモル)を加え、ついでジシクロヘキシルカルボジイミド (456mg、2.2ミリモル)を加えて N-スクシンイミドフェニルアセテート 3 を得た。反応混合物を 10 時間攪拌し、沈殿したジシクロヘキシル尿素を濾過して除いた。化合物 3 を含有する濾液を反応フラスコに戻し、これに L-グルタミン t-ブチルエステル塩酸塩 4 (439mg、1.84ミリモル)のようなカルボキシル基保護グルタミンを加えた。トリエチルアミンで pH を 9 に調節し、反応混合物を 24 時間攪拌してフェニルアセチルグルタミン t-ブチルエステル 5 を得た。沈殿した結晶を濾過して除き、真空下で濃縮した後、化合物 5 を含有する濾液を、溶出液として酢酸エチル-メタノール (95:5) を用いたシリカゲル上のカラムクロマトグラフィーで精製した。所望の化合物の収量: 299mg。融点: 132~133℃。  
<sup>1</sup>H-NMR (60MHz) (CDCl<sub>3</sub>) δ ppm: 1.4 (s, 9H), 1.8~2.4 (mult, 4H), 3.6 (s, 2H), 4.5 (mult, 1H), 5.5 (broad, 1H), 6.3 (mult, 2H), 7.3 (s, 5H)

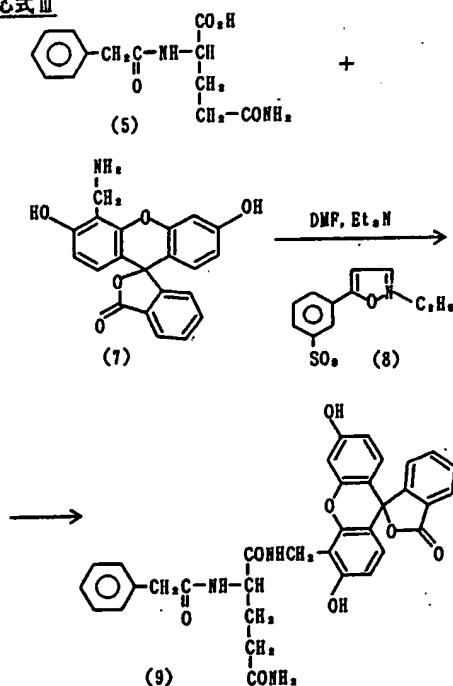
#### 反応式 II



反応式 II に示すように、フェニルアセチルグルタミン 6 (117mg、0.441ミリモル)をジメチルホルムアミド (1.8ml)に溶解させ、N-ヒドロキシスクシンイミド 2 (61mg、0.529ミリモル)、ついでジシクロヘキシルカルボジイミド (109mg、0.529ミリモル)を加えた。12時間後、0.1Mリン酸バッファー (10ml, pH=7.8)に溶解したウシ血清アルブミン (500mg)を加え、反応混合物をさらに 18 時間攪拌した。反応混合物を水に対して透析し、凍結乾燥して免疫源結合体 10 (502mg)を得た。

**実施例3** [アミノメチルフルオレセイン(AMF)  
へのフェニルアセチルグルタミン(PAG)の結合]

**反応式 III**



リウム-3'-スルホネート(53mg)を加えた。トリエチルアミンを用いて反応混合物のpHを9に調節した。90分後、グリシン-γ-ブチルエステル塩酸塩(32mg)を加え、反応混合物をさらに12時間攪拌し、蒸発乾固し、溶出液として酢酸エチル-メタノール(90:10)を用いたプレパラティブ薄層クロマトグラフィーにより精製した。収率: 63%。融点: 173~175℃。マスペクトル(DC1/NH<sub>3</sub>/DIP): 395(M+NH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>(13%), 378(M+H)<sup>+</sup>(18%), 153(100%)

このPAG-グリシン結合体は、今度はPAGに対する抗体を産生させるためにウシ血清アルブミンに、トレーサーとして用いるためにフルオレセインに結合させることができる。

**実施例5** (抗血清の製造)

ウサギをまず実施例2の免疫源(1mg)で免疫し、引き続き6週毎に免疫源(0.5mg)をブースター投与した。各ブースター投与後約2週間で出血させた。ほどよい希釈で適当な結合および置換を示す抗血清を選択するために出血した血液を滴定し

反応式IIIに示すように、実施例1で得たフェニルアセチルグルタミン5(25mg)をジメチルホルムアミド(500μl)中に溶解し、2-エチル-5-フェニルイソキサゾリウム-3'-スルホネート8(26mg)を加えた。トリエチルアミンを用いて反応混合物のpHを9に調節した。45分後にアミノメチルフルオレセイン塩酸塩7(38mg)を加え、反応混合物をさらに12時間攪拌した。蒸発乾固した後、残渣をメタノール中に溶解し、逆(reversed)シリカゲルおよび溶出液として水-メタノール-酢酸(40:60:0.4)を用いたプレパラティブ薄層クロマトグラフィーにより精製した。得られた生成物は、所望のPAG/AMF結合体(40mg)であった。

マスペクトル(FAB): 608 M<sup>+</sup>

**実施例4** (グリシン-γ-ブチルエステルへのフェニルアセチルグルタミンの結合)

実施例1で得たフェニルアセチルグルタミン(50mg)を無水ジメチルホルムアミド(800μl)中に溶解し、2-エチル-5-フェニルイソキサゾ

リウム-3'-スルホネート(53mg)を加えた。トリエチルアミンを用いて反応混合物のpHを9に調節した。90分後、グリシン-γ-ブチルエステル塩酸塩(32mg)を加え、反応混合物をさらに12時間攪拌し、蒸発乾固し、溶出液として酢酸エチル-メタノール(90:10)を用いたプレパラティブ薄層クロマトグラフィーにより精製した。収率: 63%。融点: 173~175℃。マスペクトル(DC1/NH<sub>3</sub>/DIP): 395(M+NH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>(13%), 378(M+H)<sup>+</sup>(18%), 153(100%)

**実施例6** (イムノアッセイ)

(a) トレーサー溶液の調製:

トレーサー溶液(25μl)を下記バッファー溶液(1975μl)に溶解したときにトレーサー溶液の蛍光強度が5000~6000ユニットとなるように、塩化ナトリウム(1.0g)、アジ化ナトリウム(0.1g)、チオ硫酸ナトリウム(0.1g)、グリセロール(25μl)、ジメチルホルムアミド(25μl)および水(50μl)を含有する溶液に実施例3で得たトレーサーを溶解した。

(b) ポッパー(Popper)溶液の調製:

トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン(0.12g)、ラウリル硫酸ナトリウム(0.1g)およびアジ化ナトリウム(0.01g)を水(100μl)に溶解した。

## (c) 抗血清溶液の調製:

一塩基性リン酸カリウム(0.054g)、二塩基性リン酸カリウム(0.164g)、アジ化ナトリウム(0.01g)、塩化ナトリウム(0.9g)およびニワトリ卵アルブミン加水分解物(1.0g)を水(100ml)に加えることにより溶液を調製した。溶液中での希釈が1~8倍となるように実施例5の抗血清をこの溶液に加えた。

## (d) 人造尿の調製:

尿素(2.0g)、クレアチニン塩酸塩(0.20g)、塩化ナトリウム(1.0g)、硫酸カリウム(0.17g)、一塩基性リン酸カリウム(0.176g)、二塩基性リン酸カリウム(0.14g)、硫酸マグネシウム(0.12g)、アジ化ナトリウム(0.10g)、チオ硫酸ナトリウム(0.1g)および水酸化ナトリウム(pHを7.3~7.5に調節するため)を水(1.0l)中で混合することにより人造尿を調製した。人造尿はカリブレーターおよびコントロールを調製するために用いる。

人造尿中のPAG(実施例1で得たもの)の標準

料のアリコート(0.5μl)を抗血清(12.5μl)およびトレーサー(25μl)とともにキュベット中に置く。試料を3分間インキュベートした後、最終の偏光の読み取りを各試料について行い、各場合について最終の読み取りからバックグラウンドの読み取りを差し引くことにより補正值を得る。この補正值を上記標準値と比較して各試料中のPAG濃度を得る。

## 実施例7

本実施例では本発明の蛍光偏光イムノアッセイ法(FPIA)の正確さを、現在用いられているガスクロマトグラフィー-マススペクトル(GC-MS)検出と比較して述べる。

## GC-MS対FPIA(n=40)

切片=1.124

傾き=0.8935

相関係数=0.9748

結果を第2図に示す。

GC/MS法では試料中のフェニル酢酸の全量を、FPIAアッセイではPAG(フェニル酢酸

溶液を以下の濃度(フェニル酢酸当量で表してある)で調製した。0、25、50、100、150および300μg/ml。

各標準溶液(0.5μl)のアリコートをキュベット中で抗血清(12.5μl)およびバッファー溶液(25μl)と混合した。数分後、アボットTdx蛍光偏光装置上で蛍光バックグラウンドの読み取りを行った。

各カリブレーター(0.5μl)を抗血清(12.5μl)およびPAG/AMFトレーサー溶液とともに再びキュベットに移した。約3分間のインキュベーションの後、最終の読み取りを行い、各カリブレーターについてバックグラウンドの読み取りを差し引いた後、PAG濃度の値を標準曲線として保存した。結果を第1図に示す。

各試料のアリコート(0.5μl)をキュベット中で抗血清(12.5μl)およびバッファー溶液(25μl)とともに混合し、バックグラウンド蛍光偏光の読み取りを行うことにより実際の尿試料を分析する。バックグラウンドの読み取りの後、各試

料として)を測定するにもかかわらず、両方法の相関関係は非常に高い。このことは、FPIAの尿PAGアッセイにより尿におけるフェニル酢酸の排泄を有効かつ正確に測定することができることを示している。

GC/MS法は非常に時間と労力がかかるため、本実施例では40の試料をアッセイするのに5日間かかる。しかし、本発明のFPIA法によれば同じ40の試料を分析するのに約30分で済む。

## 実施例8 [標準添加回収(Standard Additional Recovery)]

本実施例では3つの尿試料にPAGを添加(spike)し、各場合での添加のパーセントを測定した。

各試料のアリコート中で以下の添加PAG濃度を得られるように、各尿試料の4つのアリコートにPAGを添加した。150、100、50および25μg/mlフェニル酢酸当量。

試料と同様に処理した人造尿中のPAGからなるカリブレーターを用い、標準曲線を作成した。標準曲線を測定系に保持し、試料を該曲線と比べ



た。

添加処理尿試料中で回収された添加PAGのパーセントを、①測定した尿添加濃度から内生的PAG(0 $\mu$ g/ $\mu$ l添加)を差し引き(すなわち調節濃度=測定濃度-内生PAG、フェニル酢酸(PA)当量として)、②PAG添加の目標値で除することにより決定した。

$$\text{回収率(\%)} = \frac{\text{調節濃度}}{\text{添加PAGの濃度}} \times 100$$

結果を第1表に示す。第1表に示されるように各場合における回収率は92%を上回っている。

第1表 ヒト添加処理尿試料からの回収率

	添加濃度	調節濃度	回収率(%)
試料1	25.00	24.49	97.9
	50.00	47.58	95.2
	100.00	95.2	95.2
	150.00	146.47	97.6
試料2	25.00	23.21	92.4
	50.00	47.18	94.4
	100.00	93.5	93.5
	150.00	138.88	92.6
試料3	25.00	23.43	93.7
	50.00	47.52	95.04
	100.00	95.6	95.6
	150.00	146.75	97.8

#### 実施例9

らの試料(1~20)のあいだで偶発的な時間の差異(たとえば機械操作による時間の差異)があっても結果においてなら有意の影響を及ぼさなかったことを示している。従って、3分間のインキュベーションは反復可能で正確な結果を達成したものである。

第2表

グループ	混合/時間的調節(Timing)			
	5グループ内の標準偏差(mP's)			
	テストI		テストII	
	A	L	A	L
1	1.06	0.75	0.59	0.62
2	0.27	0.25	0.62	0.73
3	0.73	0.49	0.55	0.57
4	1.16	0.49	0.88	0.54
グループペア	5グループそれぞれのあいだの平均mP差異			
	テストI		テストII	
	A	L	A	L
1と2	0.07	0.13	0.18	0.11
1と3	0.04	0.20	0.39	0.58
1と4	0.20	0.24	0.44	0.32
2と3	0.03	0.07	0.21	0.69
2と4	0.13	0.11	0.26	0.43
3と4	0.16	0.04	0.05	0.26

(注) A = 0 PAG/ $\mu$ l

L = PAA/ $\mu$ lとして25 $\mu$ gPAG

本実施例では、本発明の新規な抗血清の特徴を記載する。実施例5記載の手順を用い、ウサギに上述の免疫原(実施例2)を接種しブースター投与した。得られた抗PAG抗血清は、非常に急速な結合および置換動態を示すことが観察された。結合および置換のためのインキュベーション時間はわずかに3分間であった。3分間インキュベーションの適切さを、一個の試料を20部、5グループに分け2回テストする(テストIおよびテストII、第2表参照)ことにより試験した。試験は、0 $\mu$ g/ $\mu$ lPAGのAレベルおよび30 $\mu$ g/ $\mu$ lPAGのLレベルの2段階で行った。Aレベルはトレーサー(実施例3)の結合運動を試験するために、LレベルはトレーサーのPAG(実施例1)による置換運動を調べるために用いた。結果を第2表に示す。各グループについての平均の偏光は実質的に同一にとどまり、5グループ内の標準偏差は1 $\mu$ p未満、すなわち1%よりもはるかに小さいものであった。これらの結果は、結合の非常に急速な運動のために平衡が非常にすばやく達成され、これ

#### 実施例10

本発明の抗体の特異性を確立するために、構造的に関連した幾つかの化合物とPAGとの交差反応性をアボット・ラボラトリーズTdxアッセイで調べた。これらの関連化合物が1000 $\mu$ g/ $\mu$ lまでのレベルにおいてさえも、第3表に示すように交差反応性は観察されなかった。

各化合物につき種々の濃度(0.1~1000 $\mu$ g/ $\mu$ l)を含有する溶液を調製した。ついで各溶液を、PAGについて蛍光偏光イムノアッセイを行うようにして分析した。検出可能な濃度が観察されたら、それはPAG抗体との化合物の交差反応性を示す指標となるであろう。もちろん、いかなる交差反応性も望ましいものではない。

第3表 交差反応性

化合物	濃度 (mg/ml)				
	0.1	1.0	10.0	100.0	1000.0
$\beta$ -PEA	ND*	ND	ND	ND	0.57
5HTAA	ND	ND	ND	ND	ND
D, L-DOPA	ND	ND	ND	ND	ND
トリプタミン	ND	ND	ND	ND	ND
3, 4-ジヒドロ PEA	ND	ND	ND	ND	ND
MHPG	ND	ND	ND	ND	ND
p-ヒドロキシPAA	ND	ND	ND	ND	ND
m-ヒドロキシPAA	ND	ND	ND	ND	ND
(R)2PAA	ND	ND	ND	ND	ND
(S)2PAA	ND	ND	ND	ND	ND
PAA	交差反応性なし				
トリプタミン	交差反応性なし				

(注)ND:交差反応性検出されず

## 4. 図面の簡単な説明

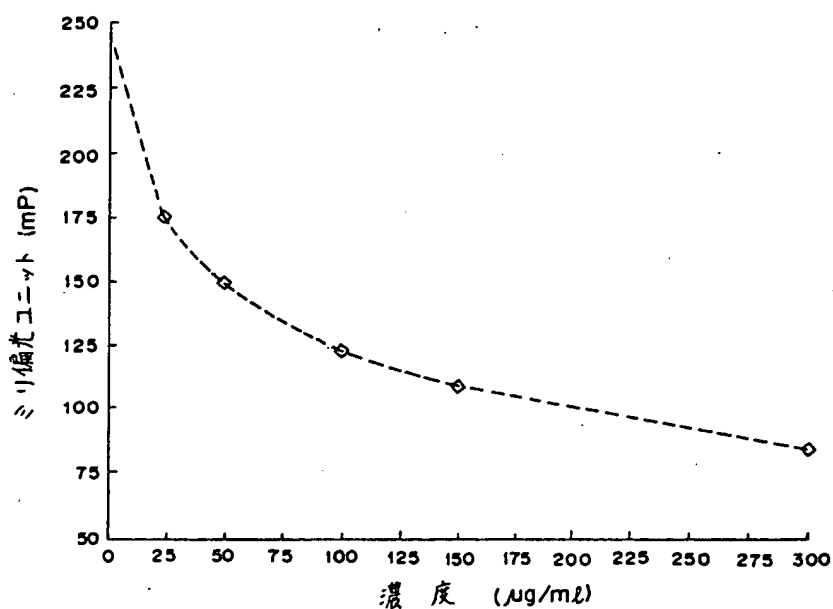
第1図は、PAG濃度とミリ偏光ユニットとを  
プロットしたPAG標準曲線を示すグラフ、第2

図は、従来のガスクロマトグラフィー/マススペ  
クトル法と本発明の蛍光偏光イムノアッセイ法と  
の相関関係を示すグラフである。

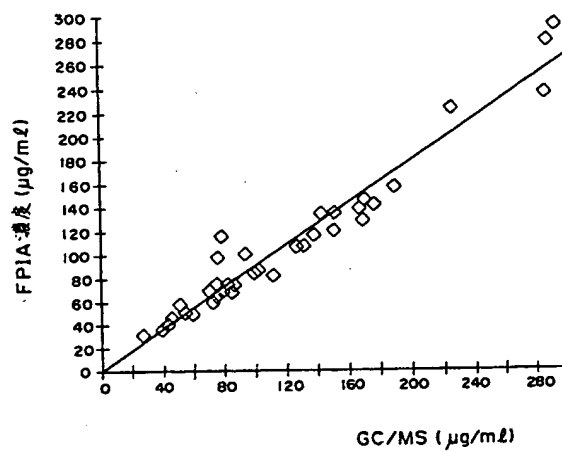
特許出願人 アボット・ラボラトリーズ

代理人 弁理士 青山 保 ほか1名

第1図



第2図



第1頁の続き

⑤Int. Cl.<sup>4</sup>

C 09 B 11/00  
G 01 N 33/53  
33/533  
33/542

識別記号

庁内整理番号

P-8217-4H  
S-7906-2G  
7906-2G  
A-7906-2G

⑦発明者 ドナルド・デュアン・  
ジョンソン

アメリカ合衆国イリノイ 60046、リンデンハースト、メ  
イプルウッド・ドライブ 1829番